

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—193354

⑪ Int. Cl.³
G 01 N 33/50
31/22

識別記号
1 2 2

府内整理番号
E 8305—2G
7621—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)11月1日
発明の数 4
審査請求 未請求

(全 19 頁)

⑭ 過酸化物活性物質検出用組成物、試験手段及び該試験手段の製造方法並びに過酸化物活性物質の検出方法

⑮ 特 願 昭59—54575

⑯ 出 願 昭59(1984)3月23日

優先権主張 ⑰ 1983年3月28日 ⑳ 米国(US)

⑳ 479126

⑰ 1984年2月2日 ⑳ 米国(US)

⑳ 575725

⑰ 発明者 クリストイーン・マヤンバラムワニカ

アメリカ合衆国インヂアナ4654

5ミシシヤウオーカ215バーカド。

プレイス・ナンバー 4

⑰ 発明者 ロドリック・ハロルド・ホワイ
トースティーブンス

アメリカ合衆国インヂアナ4654
0ミドルバリー・ピー・オー・
ボックス347

⑰ 出願人 マイルス・ラボラトリーズ・イ
ンコーポレーテッド
アメリカ合衆国インヂアナ4651
5エルクハート・ミルトル・ス
トリート1127ピー・オー・ボツ
クス40

⑰ 代理人 弁理士 津国肇

ル或いはアルキルカルボン酸基を有し、R₁、
R₂、R₃、R_x 又はR_y のうち少なくとも2個
は前記のアルキルカルボン酸基であり；

(b) R_p 及びR_q は同一又は異なり、1～3個の
炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖アルキレン基又
は6～9個の炭素原子を有する2価の1、2～脂
環式基を有し；

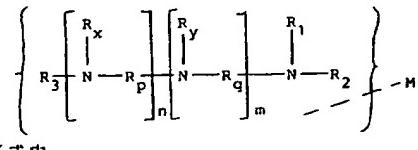
(c) n は0～1の数値を有する整数、m は0～2
の数値を有する整数であり、m が0より大きい場
合には、反復されるR_p 及び反復されるR_q 基は
同一又は異なるとしてもよく、

(d) M はFe⁺³である) を有するポリカルボキシア
ルキアミン誘導体の金属キレートを含むことを
特徴とする過酸化物活性物質の存在の検出用組成
物。

(2) (a) m が0 であり、

(b) R_p がエチレン基である特許請求の範
囲第1項記載の組成物。

(3) R₁、R₂、R₃、R_x 及びR_y のうち少
なくとも2個がアルキルカルボン酸基—CH₂COOH



(式中)

(a) R₁ は水素又は2～3個の炭素原子を有する
直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いは
アルキルカルボン酸基を有し、R₂、R₃、R_x
及びR_y は同一又は異なり、2～3個の炭素原子
を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコー

である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(4) 指示薬がベンジン、o-トリジン、3, 3', 5, 5'-テトラ(低級アルキル)ベンジン、2, 7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(5) 金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸、エチレンジアミン四酢酸、シクロヘキシンジアミン四酢酸、ニトロ三酢酸、イミノ二酢酸、 α -エチレンジアミンニ酢酸ニプロピオン酸、 β -エチレンジアミンニ酢酸ニプロピオン酸、ヒドロキシエチルアミンニ酢酸及びこれらの混合物の鉄キレートから成る群から選択されたものである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(6) 金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の鉄キレートである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

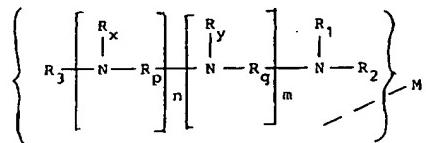
(7) 金属キレートがエチレンジアミン四酢酸の鉄キレートである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(8) 有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシド、1-ブチルヒドロバーオキシド、ジソブロビルベンゼンヒドロバーオキシド、2, 5-ジメチルヘキサン-2, 5-ジヒドロバーオキシド、バラメンタンヒドロバーオキシド及びこれらの混合物から成る群から選択されたものである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(9) 有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシドであり、指示薬が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(10) 指示薬が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンであり、金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の鉄キレートであり、有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシドである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(11) 有機ヒドロバーオキシド、過酸化物活性物質及び過酸化物の存在で検出可能の応答を生じる指示薬並びに一般式



〔式中〕

(a) R₁ は水素又は2~3個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、R₂、R₃、R_X 及び R_Y は同一又は異なり、2~3個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、R₁、R₂、R₃、R_X 又は R_Y のうち少なくとも2個は前記のアルキルカルボン酸基であり；

(b) R_p 及び R_q は同一又は異なり、1~3個の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖アルキレン基又は6~9個の炭素原子を有する2価の1, 2-脂環式基を表し；

(c) n は0~1の数値を有する整数、m は0~2の数値を有する整数であり、m が0より大きい場合には、反復される R_p 及び反復される R_q 基は

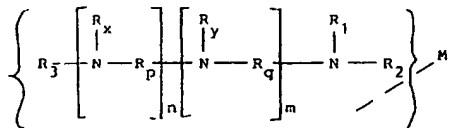
同一又は異なっていてもよく、

(d) M は Fe⁺³ である) を有するポリカルボキシアカルキルアミン誘導体の金属キレートを含む過酸化物活性物質の存在の検出用組成物を組み込んだ支持体マトリックスを含む、試料中の過酸化物活性物質の存在を検出する試験手段。

(12) 特許請求の範囲第2項~第10項のいずれかの組成物を組み込んだ支持体マトリックスを含む、試料中の過酸化物活性物質の存在を検出する試験手段。

(13) 試料中に存在しうるアスコルベートの妨害作用に対して抵抗性である、試料中の過酸化物活性物質の存在を検出する試験手段を製造するため、

a) 有機ヒドロバーオキシド、及び一般式：



〔式中〕

(i) R_1 は水素又は2~3個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、 R_2 、 R_3 、 R_x 及び R_y は同一又は異なり、2~3個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_x 又は R_y のうち少なくとも2個は前記のアルキルカルボン酸基であり；

(ii) R_p 及び R_q は同一又は異なり、1~3個の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖アルキレン基又は6~9個の炭素原子を有する2価の1, 2-脂環式基を表し；

(iii) n は0~1の数値を有する整数、 m は0~2の数値を有する整数であり、 m が0より大きい場合には、反復される R_p 及び反復される R_q 基は同一又は異なっていてもよく、

(iv) M は Fe^{+3} である)を有するポリカルボキシアルキルアミン誘導体の金属キレートを含む第一試薬溶液を製造し、

b) 支持体マトリックスを第一試薬溶液で湿润さ

ることによって支持体マトリックスに第一試薬溶液を組み込み、

c) 濡潤したマトリックスを乾燥して金属キレート及びヒドロバーオキシドを残留させ、

d) 過酸化物及び過酸化物活性物質の存在で検出可能の応答を生じうる指示薬及び溶剤を含む第二試薬溶液を製造し、

e) マトリックスを第二試薬溶液で濡潤することによって、乾燥支持体マトリックスに第二試薬溶液を組み込み、

f) マトリックスを乾燥して金属キレート、ヒドロバーオキシド及び指示薬を含む混合溶液を残留させる工程から成る過酸化物活性物質の存在を検出する試験手段の製造方法。

(14) (a) m が0であり、

(b) R_p がエチレン基である特許請求の範囲第13項記載の方法。

(15) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_x 及び R_y のうち少なくとも2個がアルキルカルボン酸基-COOH、COOIIである特許請求の範囲第13項記載の

方法。

(16) 指示薬がベンジン、o-トリジン、3, 3', 5, 5'-テトラ(低級アルキル)ベンジン、2, 7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物である特許請求の範囲第13項記載の方法。

(17) 金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸、エチレンジアミン四酢酸、シクロヘキシレンジアミン四酢酸、ニトリロ三酢酸、イミノ二酢酸、 α -エチレンジアミン二酢酸ニプロピオン酸、 β -エチレンジアミン二酢酸ニプロピオン酸、ヒドロキシエチルアミノ二酢酸及びこれらの混合物の鉄キレートから成る群から選択されたものである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(18) 金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の鉄キレートである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(19) 金属キレートがエチレンジアミン四酢酸の鉄キレートである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(20) 有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシド、 α -ブチルヒドロバーオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロバーオキシド、2, 5-ジメチルヘキサン-2, 5-ジヒドロバーオキシド、バラメンタンヒドロバーオキシド及びこれらの混合物から成る群から選択されたものである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(21) 有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシドであり、指示薬が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(22) 指示薬が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンであり、金属キレートがN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の鉄キレートであり、有機ヒドロバーオキシドがクメンヒドロバーオキシドである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(23) 試料を特許請求の範囲第11項記載の試験手段と接触させる工程及び検出可能な応答を観察する工程を含む、試料中の過酸化物活性物質の

存在を検出する方法。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

発明の分野

本発明は、一般に試料中の過酸化物活性物質の分析測定、特にこのような測定に有用であって、試料中に存在するかもしれないアスコルビン酸からの有害な作用に対して抵抗性の組成物、試験手段、試験具及び試験方法に関する。

背景技術

生物学的試料、例えば尿、糞便懸濁液及び胃腸内容物中の過酸化物活性物質の存在を検出するため、現在、多数の分析方法を利用することができます。例えば、潜血試験によって測定される被分析物であるヘモグロビン及びその誘導体は、バーオキシダーゼ酵素と同様な挙動を示すので、過酸化物活性物質の代表であり、これら自体はブソイドバーオキシダーゼとも言われる。過酸化物活性物質は過酸化物又はヒドロバーオキシドと変色のような検出可能な応答を生じる指示薬、例えばベン

ジン、6-トリジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン等との間のレドックス反応を触媒する点で酵素に似ている。従って、試料中の潜血の存在を測定するほんどの方法は、このブソイドバーオキシダーゼ活性に依存する。

着色指示薬の過酸化物酸化の酵素様触媒作用に依存する、過酸化物活性物質を測定する多数の分析方法が開発された。第一、これらは湿式化学又は溶解操作及びいわゆる「浸漬-読み取り（dip-and-read）」型試薬保持ストリップ具を含む。前者の代表的例は、ヘンリイ（R. H. Henry）ら著クリニカル・ケミストリィ・プリンシップス・アンド・テクニクス（Clinical Chemistry Principles and Techniques）、第二版1124～1125（メリーランド州ハーガースタウン：Harper and Row、1974）に示されている。この操作の例は氷酢酸（緩衝剤）、ジフェニルアミン（指示薬）及び過酸化水素を使用するものである。このような湿式化学法は分析に有用であるこ

とが証明されているが、これらの方法は多くの欠点を有し、そのうち2点を例示すると、試薬が安定性に欠け、感度が不適当であるという欠点がある。

過酸化物活性物質を測定する別の方法で、現在多くの臨床分析者によって好ましいと言われている方法は、いわゆる「浸漬-読み取り」試薬ストリップ具を利用していている。このような「浸漬-読み取り」具の代表的なものは、マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド（Miles Laboratories, Inc.）のエームス・ディビジョン（Ames Division）から商標ヘマスティックス（HEMASTIX）の下に市販されている。この試験具は、多孔性紙マトリックスに、有機ヒドロバーオキシドと指示薬との緩衝混合物を含浸させたものをプラスチックストリップ又はハンドルに固定して成る。このマトリックスをヘモグロビン、ミオグロビン、赤血球又は他の過酸化物活性物質、即ち、ブソイドバーオキシダーゼを含む液体中に浸漬すると、マトリックスに青色が現れ、その強度

は試料中の物質の濃度に比例する。マトリックス中に現れた色を標準カラーチャートと比較することによって、分析者は試料中に存在する被分析物の量を半定量的に測定することができる。

第一に、このような試薬ストリップの、湿式化学法に対比した利点は、1) ストリップ型は使用しやすく、試薬の製造も、付随する装置も必要としないし、2) ストリップ中で試薬は一層安定になり、精度、感度及び経済性が改善される。

過酸化物活性種に関する特定の分析を前記の方のどちらで行っても、両方に固有の問題が存在する。即ち、試料中に一般に還元剤及び特にアスコルビン酸又はアスコルビン酸イオンの存在によって妨害が起こる（以下、アスコルベート妨害と書く）。例えば、尿分析の場合、高投与量のビタミンC（アスコルビン酸）を含む最近の食餌人気は、一定の尿成分、例えば潜血を分析する際に重大なアスコルベート妨害の問題を起こす。

早くも1938年に、アスコルビン酸塩のような還元剤の有害な作用が認識された。コーン（R.

Kohn) 及びワトラス (R. M. Watrous) 著、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリイ (Journal of Biological Chemistry) 、124: 163~168 (1938)。溶血 (アソイドバーオキシダーゼ) 分析を実施する場合に、同時にアスコルベート分析も実施して溶血測定の精度を評価すべきであるという 1979 年の提案によって証明されるように、診断分析のこの分野で同じ問題になお悩まされている。ニールセン (L. Nielsen)、ヨルゲンセン (P. J. Jorgensen) 及びハンセン (A. C. Hansen) 著、Ugeskrift for Laeger. 141、791~793 (1979)。

試験系、例えばグルコース感受性試薬を含む系に対するアスコルベート妨害を除去する試みは多数、文献に報告されている。グルコース感受性分析に際して、アスコルベートが試薬に到達する前にアスコルベートを遮去する方法から、その場でアスコルベートを分解する酵素を利用する方法まで種々のアプローチがある。

Dahlqvist のカナダ特許第 844564 号明細

料を前処理し、次にコレステロール、グルコース又は他の成分、例えば尿酸を分析することが開示されている。

クー (Ku) の米国特許第 3,411,887 号明細書には、アスコルベート「トラッピング系」を使用することによって、酵素酸化性物質、例えばグルコースオキシダーゼに依存する試薬系を用いてアスコルベート妨害を排除することが記載されている。「トラッピング系」は、イオン化されたときに、レドックス指示薬色素とアスコルベートとの間で酸化-還元電位を降下するイオン化可能な重金属化合物に関する。適当な金属は、例えばコバルト、鉄、水銀及びニッケルである。

マガース (Magers) らに付与され、正式に譲渡されている米国特許第 4,288,541 号明細書には、グルコース/グルコースオキシダーゼ分析系にアスコルベート抵抗性を付与するため水銀イオン錯体、例えばサルコシン酸水銀を使用することを記載している。

前記文献の他に、グルコース試験に伴うアスコ

ルベートの問題に関する注意は、下記の文献に記載されている：

書は、尿又は他の媒体中でグルコースを測定する測定具を開示しており、このものは通常のグルコース応答性試薬で合併した多孔性部分の他に、尿・試料を受理する付加的部を含む。試料受理部分は、測定具におけるただ一つの機能が尿試料中に存在するアスコルベートを吸着することであるイオン交換物質を含む。

ダニンガー (Danninger) らに付与された米国特許第 4,168,205 号明細書は、試験試薬の処方に酵素であるアスコルベートオキシダーゼを配合することを示唆している。この場合、試料中に存在するアスコルベートは、アスコルベートオキシダーゼによって酵素酸化されて、所望の分析に悪影響を及ぼさない化合物であるデヒドロアスコルベートを生じる。

アスコルベート妨害を排除する別のアプローチは、富士薬器製薬株式会社の特開昭 58-55757 号公報に記載されている。該公報には、種々のリガンド、例えばエチレンジアミン四酢酸及びジェチレントリアミン五酢酸の金属キレートを使用して試

ルベートの問題に関する注意は、下記の文献に記載されている：

1. ギフォード (H. Gifford) ら、J. Amer. Med. Assoc. 、178、149~150 (1961)。
2. オーゴーマン (P. O'Gorman) ら、Brit. Med. J. 、603~606 (1960)。
3. ブラント (R. Brandt) ら、Clin. Chem. Acta. 51、103~104 (1974)。
4. ブラント (R. Brandt) ら、Am. J. Clin. Pathol. 68、592~594 (1977)。

前記のクーの特許のアプローチと同様に、他の文献はコバルトを使用してアスコルベートを錯体とし、酸化している。例えば、ブラガグノロ (G. Bragagnolo) 著、Ann. Chim. Applicata 31、350~368 (1941) は、アスコルビン酸の溶液を金属コバルトの存在で空気で酸化することを報告した。また、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサイエティ・オブ・ジャパン (Journal of the Chemical Society of Japan) 、63、

820～826 (1942) に岩崎トモキチによって $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ に関する同様の活性が報告された。

前記の文献はグルコース測定用の分析系を広範に扱っているが、バーオキシダーゼ及びブソイドバーオキシダーゼのような過酸化物活性物質、例えば溶血（ヘモグロビン）の測定に関連するアスコルベート妨害の問題を解決するための示唆は全くされていない。前記のクーの特許に開示されているにもかかわらず、前記文献は、 $\text{Co}(\text{III})$ のような金属イオンが実際にブソイドバーオキシダーゼでもあることを示している。例えば、酢酸コバルト（III）は、クメンヒドロバーオキシドを触媒により分解するために工業的に使用される。

（ザ・メルク・インデックス (The Merck Index)、第9版311 (1976)。）ロー (K. Lohs.)、Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin、8、657～659 (1966) (Chem. Abstracts、67、120383z、1967参照) によって過酸化物を触媒により分解する一連の $\text{Co}(\text{III})$ 錯体が報

告されている。従って、過酸化物活性物質を測定する典型的な分析用調製物、即ち有機ヒドロバーオキシド及び指示薬を含む分析用調製物にこのような金属錯体を使用すると、ヒドロバーオキシドとの有害な反応を起こして、「偽陰性」の結果を生じるか、又は問題の過酸化物活性物質、例えば溶血に対して反応しないようにし、従ってこのような測定に使用できなくなると、当業者が考えるであろうことは明らかである。実際、溶血試験に水銀錯体、例えばサルコシン酸水銀を使用する努力は失敗した。

正式に譲渡されているブルクハルト (Burkhardt) らの米国特許第4,310,626号明細書は、前記問題に関して、過酸化物活性物質の測定用組成物とのアスコルベート妨害を軽減するためアンモニウム $\text{Co}(\text{III})$ 錯体を使用することを記載している。この特許は有機ヒドロバーオキシド及び適当な指示薬、例えば3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンをアンモニウム $\text{Co}(\text{III})$ 錯体、例えば特に $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ と一緒に含む組成物を開示し

ている。しかしながら、これらの錯体は溶血試験に産業的に有利である程、充分なアスコルベート抵抗性を与えたかった。

過酸化物活性物質の分析測定におけるアスコルベート妨害に関する他のアプローチとして、例えば西ドイツ特許第29,07,628号明細書がある。このドイツ特許は、溶液中での尿分析に関し、原試料を1種以上の酸化剤で前処理してアスコルベートを除去し、次に適当な分析試薬と接触させる。開示されている酸化剤は、沃素酸ナトリウム、過沃素酸ナトリウム、次亜塩素酸カルシウム、三沃化カリウム、次亜塩素酸ナトリウム、クロロアミン及びプロモサクシンイミドである。

要するに、過酸化物活性物質の測定においてアスコルビン酸が起こす妨害問題を排除するための種々のアプローチは、種々の $\text{Co}(\text{III})$ アンモニウム錯体の使用、酸化剤による試料の前処理及び試薬組成物へのアルカリ金属沃素酸塩の直接添加のような技術を含んでいた。

西洋わさび又はボテトから得られるバーオキシ

ダーゼのような天然バーオキシダーゼの作用のメカニズムを解明するため、別のバーオキシダーゼ系としてブソイドバーオキシダーゼ、例えばヘモグロビンがしばしば研究される。アスコルビン酸はバーオキシダーゼに対する代表的基質として長い間知られており、ブソイドバーオキシダーゼとして作用する金属キレートの存在でのアスコルビン酸酸化は公知の現象である。1967年及び1968年に、カーン (M. Khan) 及びマーテル (A. Martell) は、1.8～3.45のpH範囲にわたって数種の鉄キレート及び銅キレートの存在でのアスコルビン酸の酸化の動的研究について報告した (カーン及びマーテル著、J. Am. Chem. Soc.、89、4176 (1967); J. Am. Chem. Soc.、89、7104 (1967); J. Am. Chem. Soc.、90、3386 (1968))。これらの研究においては、多数の動的及び熱力学的パラメータが研究された。その結果は、アスコルビン酸を酸化する能力による種々のキレートの順位であった。これらの著者の研究した4種のアミノポリカルボ

ン酸のうち、 Fe^{+3} の N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸 (HEDTA) キレートが、最も迅速な酸化剤であることが判明した。マーテルの研究及びグリンステッド (Grinstead) による更に早期の研究は、「モデル」バーオキシダーゼ系を構成するためこのアスコルビン酸酸化活性を考えている [グリンステッド、J. Am. Chem. Soc., 82, 3464 (1960)]。グリンステッドによる前記のような研究から、構造が酵素バーオキシダーゼの活性部位に見られる鉄含有ペムの構造と類似している鉄キレートを用いてバーオキシダーゼメカニズムを研究する試みがなされた。事実、その著者はその論文に反復して「モデルバーオキシダーゼ系」という文言を使用している。しかしながら、このキレート及び反応において類似の他の物質によって「モデル」バーオキシダーゼ活性が示されるので、このような物質を有機ヒドロバーオキシドノ指示薬系、例えばバーオキシダーゼ又は他の過酸化物活性物質の測定用の分析試薬組成物及び測定具に現在使用されている。

る。

発明の概要

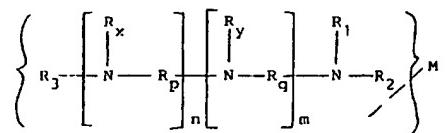
前記の教示及び示唆にもかかわらず、ある種の過酸化物活性金属キレート及び特にポリカルボキシアルキルアミンの金属キレートを本発明方法に使用する場合には、過酸化物活性物質を測定する試薬系を含む組成物において予期された「偽陽性」結果を生じないばかりでなく、実際にこのような系において被分析物を測定すべき系の信頼性、安定性及び感度の意味で意外に有利である。更に、本発明により金属キレートを使用すると、特に試料中に存在するアスコルビン酸イオンからの妨害によって起こされる不正確さを克服した点で特に有利であることが判明した。

従って、本発明はこの発見に基づくもので、前記のように、一般に、アスコルベート妨害に対して抵抗性である過酸化物活性物質の分析測定法及び特に本発明により有機ヒドロバーオキシド及びレドックス指示薬、例えば o-トリジン又は 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) 又は o-トリジン (過酸化物活性物質の存在を検出する分析系に典型的に使用される指示薬) を用いてこのような活性はアスコルビン酸とより約 200 倍早く反応を起こすことを予期しうることが判明した。従って、このような過酸化物活性金属キレートである「モデル」バーオキシダーゼがアスコルビン酸を容易に酸化する場合、(カーン、マーテル及びグリンステッドによりなされた仮定)、TMB のような指示薬とのバーオキシダーゼ反応が、200 倍程早くないとしても (西洋わさびで行われた後者の研究で示唆された)、少なくともアスコルビン酸と同じ速度で進行する。明らかに、極めて反応性の被分析物をその被分析物の存在で変色するように構成された真的試薬調製物中に配合すると、「偽陽性」の結果が得られるであろうと予測され

過酸化物活性金属キレートを含む組成物を利用する検出法に関する。このような検出において、過酸化物活性被分析物は、酵素バーオキシダーゼに類似しているので、指示薬と有機ヒドロバーオキシドとの反応を触媒するか、又はその反応に関与する。この反応は色又は他の検出可能な応答を生じ、その強度は被分析物の濃度の指標である。アスコルビン酸イオンは、存在する場合、重大な妨害の問題を起こす。組成物中に過酸化物活性金属キレートが存在しても、過酸化物活性被分析物の分析測定を妨害することも予測されるであろう。それにもかかわらず、試料中の過酸化物活性物質の存在を検出するため、試料中のアスコルビン酸の妨害作用に対して抵抗性の新規組成物、試験手段 (及び試験具) を有効に調製できることが判明した。この組成物、試験手段 (及び試験具) は、「モデルバーオキシダーゼ」としても公知のポリカルボキシアルキルアミン誘導体の金属キレートを含む。

従って、本発明の組成物は、有機ヒドロバーオ

キシド、過酸化物活性物質及び過酸化物の存在で検出可能の応答、例えば変色を生じうる指示薬並びに、更に一般式：



〔式中 R_1 は水素又は 2 ~ 3 個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、 R_2 、 R_3 、 R_x 及び R_y は同一又は異なり、2 ~ 3 個の炭素原子を有する直鎖若しくは分枝鎖のアルキルアルコール或いはアルキルカルボン酸基を表し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_x 又は R_y のうち少なくとも 2 個は前記のアルキルカルボン酸基であり、 R_p 及び R_q は同一又は異なり、1 ~ 3 個の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖アルキレン基又は 6 ~ 9 個の炭素原子を有する 2 値の 1, 2-脂環式基を表し、 n は 0 ~ 1 の数値を有する整数、 m は 0 ~ 2 の数値を有する整数であり、M は Fe^{+3} である〕を有す

るポリカルボキシアルキルアミン誘導体である金属キレートを含む。

好みしい化合物は、 m が 0 であり、 n が 0 又は 1 であり、 R_p がエチレン基である化合物である。アルキルカルボン酸基が CH_2COOH であるポリカルボキシアルキルアミン誘導体の金属キレートは特に好みしい。

好みしい金属キレートは $N - (2 - \text{ヒドロキシエチル}) \text{エチレンジアミン三酢酸の鉄キレート (Fe-HEDTA)}$ である。

本発明の好みしい実施態様において、組成物を支持体マトリックス、吸水性紙に混入して試験手段を形成し、この試験手段を不活性支持体に固定して試験具を形成することができる。更に、試験手段（及び試験具）の製造方法及び試験方法も本発明によって提供される。

本発明により金属キレートを包含させることにより、アスコルベート妨害に対する優れた抵抗性ばかりでなく、良好な貯蔵性及び高溫安定性及び「偽陽性」結果の欠如を実験により確認できるよ

うに、意外に有利な安定性を有する組成物、試験手段（及び試験具）が提供される。

発明の詳細な説明

本発明の開発中の初期の湿式化学実験は、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の鉄キレート（以下、Fe-HEDTAと記すが、これは便宜のためだけに使用するもので、金属イオンとポリカルボキシアルキルアミン誘導体との間に共有結合の存在を意味するものではない）、アスコルビン酸及び緩衝剤を使用し、このキレートの存在でのアスコルビン酸酸化の迅速性を確認したもので、その結果はカーン及びマーテルの前記報告から予期されるであろう。従って、バーオキシダーゼ含有組成物において、このような組成物によるアスコルビン酸酸化と比較することによって、TMHがいかに早く酸化されるかが分かったので、有機ヒドロバーオキシド、酸化可能な指示薬、例えば TMH 及び更に前記のような金属キレートを含む組成物は極めて不安定であり、急速に「偽陽性」結果を生じることが予想された。

しかし、更に実験したところ、このような金属キレートを含み、過酸化物活性物質の検出に適当であり、更に乾燥固体状態の型に適合し、製造中及び貯蔵中に良好な試薬安定性を示し、既知のヘモグロビン-陰性尿と接触したときに「偽陽性」の結果を生じない組成物を調製しうることが判明した。こうして達成された本発明は、前記のように、金属キレート、例えば Fe-HEDTA は「モデルバーオキシダーゼ」として使用でき、従って過酸化物活性被分析物の濃度を測定するため組成物に使用するには不適当であろうと示唆している前記文献の示唆と矛盾する。

尿のような生物学的液体中の潜血（O B）、即ちヘモグロビンを検出するための、本発明の新規組成物から製造することができた試験手段（及び試験具）は、尿中の異常に高いアスコルビン酸濃度に対して抵抗性であることが判明した。前記のように、アスコルビン酸による阻止は、特に尿試料の約 2.5% が 1.0 mg/dL より高いアスコルビン酸濃度を示すことを予測できることを考慮すると、

重大な問題である。ある型のアスコルベート妨害遮延剤を含まない常用のO/B検出具は、通常、5 mM/dL程度の低いアスコルビン酸濃度によって阻止される（即ちヘモグロビンの存在に対してあまり鋭敏でなくされる）ことが判明した。しかし、本発明により製造される試験具は、このような従来の試験具に比して、アスコルベート妨害抵抗性の点で極めて有利であり、アスコルビン酸を比較的高い濃度で、例えば50 mM/dL程度で含む液体中の過酸化物活性物質を検出することができる。

従って、本発明は、尿のような生物学的液体中の過酸化物活性物質の検出用の組成物、試験手段（及び試験具）を提供する。本発明の組成物、試験手段（及び試験具）によって、ヘモグロビンの他に、例えば、バーオキシダーゼ、ミオグロビン、赤血球及び他のブソイドバーオキシダーゼを含めて他の過酸化物活性物質を検出することができる。本発明は、ポリカルボキシアルキルアミンの誘導体であって、生物学的液体について行われる分析に対するアスコルビン酸の有害な作用を減少又は

排除する目的で「モデルバーオキシダーゼ」と認識される金属キレートを使用する。この観点で、金属キレートはこのような液体中に存在しうるアスコルビン酸イオンの酸化を促進する作用をする。

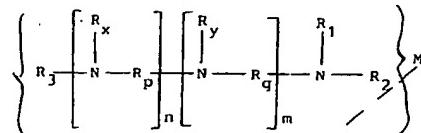
本発明の組成物、試験手段（及び試験具）は、アスコルベート妨害に対して実質的に感受性でなく、0.03 mM/dL程度或いはそれ以下の痕跡のヘモグロビンの存在に対して肉眼で又は機器で検出しうる応答、例えば色の応答を生じることが判明した。

本発明の組成物に使用する有機ヒドロバーオキシドは多数の周知有機ヒドロバーオキシドから選択することができる。しかしながら、検出可能な応答、例えば色の変化又は試験組成物によって吸収若しくは反射される光の量の変化を生じる指示薬の存在で過酸化物活性物質と反応できなければならぬ。ヒドロバーオキシドのうち特に適当なものはクメンヒドロバーオキシド、1-アチルヒドロバーオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロバーオキシド、2-, 5-ジメチルヘキサン-2,

5-ジヒドロバーオキシド、バラメンタンヒドロバーオキシド及び使用する指示薬を酸化するのに適当な他の周知のヒドロバーオキシド、又はこれらの化合物の混合物である。前記化合物のうち、クメンヒドロバーオキシドが最も好ましい。

反応して、有機ヒドロバーオキシド及び過酸化物活性物質の存在で検出可能な応答を生じることができる限り、本発明の組成物に使用するため多くの指示薬が適当である。指示薬は、例えば、いわゆる「ベンジジン-型」化合物；ベンジジン；9-トリジン；3, 3', 5, 5'-テトラ（低級アルキル）ベンジジン；2, 7-ジアミノフルオレン；及びこれらの混合物又は他の種々の指示薬の混合物である。本明細書に使用する用語「低級アルキル」は、メチル基、エチル基、n-ブロピル基及びイソブロピル基、及び種々のブチル異性体、ベンチル異性体及びヘキシル異性体を含めて炭素原子数1～6個のアルキル基である。指示薬である3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）が特に好ましい。

使用するため選択された特定の金属キレートの適格性は、アスコルビン酸の酸化を促進する能力によってばかりでなく、組成物の他の成分との相溶性によっても決定される。従って、このような適当なキレートは、下記の一般式で表されるポリカルボキシアルキルアミン誘導体の金属キレートを包含することが分かった。



従って、本発明に使用するため適当であることの分かった金属キレートは、例えばN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸鉄キレート(Fe-HEDTA)、エチレンジアミン四酢酸鉄キレート(Fe-BDTA)、シクロヘキシレンジアミン四酢酸鉄キレート(Fe-CDTA)、ニトリロ三酢酸鉄キレート(Fe-NTA)、イミノ二酢酸鉄キレート(Fe-IMDA)、エチレンジアミン二酢酸二ブロピオン酸鉄キレート(Fe-

EDDP、 α 型及び β 型)、及びヒドロキシエチルイミノ二酢酸鉄キレート(Fe-IIIMDA)並びにこれらの混合物である。鉄キレートの形が一般に好ましく、最も好ましいのは化合物はFe-HEDTA及びFe-EDTAであり、最も望ましいのはFe-IIEDTAである。しかしながら、本明細書を読んだ当業者には明らかなどおり、特に上に掲げたキレートの他に多数の適当なキレートが本発明の範囲内にある。

従って、Fe-IIEDTA及びFe-EDTA、特に、Fe-HEDTAは本発明の組成物、試験手段

(及び試験具)において得られた結果を生じ、潜在出血試験において最も満足にアスコルビン酸妨害抵抗性を生じ(ヘモグロビンを検出しうる)、使用前の良好な試薬安定性を示し、「偽陽性」の結果を生じないことが実験により分かった。更に、記載した他の金属キレート並びに多数の他のキレートも満足に作用するであろう。しかし、このような他の化合物を使用する場合に過酸化物活性物質を検出できる速度に著しい変動があることを予

想することができる。それというのは、アスコルビン酸の酸化速度が変動するからである。従って、本発明に使用するため適当な金属キレートは、前記の化合物類内のポリカルボキシアルキルアミン誘導体であるものから選択することができ、このような化合物はすべて、アスコルビン酸塩を満足に酸化することができ、本発明の範囲内に置くことができるものと理解すべきである。しかしながら、この観点で多数のものが緩徐に作用し、従って産業的用途ではあまり実用的でなく、好ましくない。

本発明に使用するのに適当な金属キレートは、アルドリッヂ・ケミカル社(Aldrich Chemical Co.)、シグマ・ケミカル・カンパニー(Sigma Chemical Company)又は同様の供給者から市販されているポリカルボキシアルキルアミン誘導体を使用して常用の実験操作によって製造することができる。例えば、金属キレートであるFe-HEDTAは、市販のHEDTA及び $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の等モル量を水溶液中で混合して鉄：キレートの

1:1(モル:モル) Fe-IIEDTA溶液を製造することによって製造することができる。金属：キレートの他の溶解濃度比は、単に、混合する溶液のそれぞれの濃度を変動することによって容易に調整することができる。アスコルビン酸妨害を克服する点で最も良好な結果は、キレートにおける金属イオン：ポリカルボキシアルキルアミン誘導体の濃度が約1:1(モル:モル)の関係にある場合に得られることが判明した。

本発明の種々の実施態様において所定の金属キレートの好ましい濃度範囲は広範に変動する。例えば、Fe-IIEDTAの場合に、有機ヒドロバーオキシド及びテトラ(低級アルキル)ベンジン指示薬を含む組成物に使用する場合、好ましい濃度範囲は約0.5ミリモル(mM)～約5.0mMである。この範囲は、尿試料中約5.0mg/dLのアスコルベート濃度まで抵抗するのに最適であることが測定された。更に、実験では、適当な鉄キレートを比較的低濃度で使用すると、比較的迅速にヘモグロビンを検出することができるが、同じキレ

ート又は他のキレートを高い濃度で使用してもあまり有効でない。これらの明らかに変則的な結果については以下に詳述するが、これらの結果は、本発明の組成物におけるキレート濃度と機能又は過格性との間に一般的な相関関係はないことを証明する。

本発明の組成物において満足に作用する適当な金属キレートの大部分は、構造的にアルキルアミン基又はアミン中心基及びカルボン酸基 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ を有する。しかしながら、このような特徴を有しないが、前記の一般的化合物範囲に属する他のキレートは、一般に、アスコルベート妨害を克服するのに有効であり、満足な感度及び安定性を示し、従って申し分なく使用される。

使用する際に、本発明の一般的概念に基づく組成物、試験手段(及び試験具)の特定の実施態様の性能は多数の異なるファクターに左右される。多量のアスコルビン酸(ビタミンC)を摂取する習慣のある人からの代表的尿試料は、しばしばアスコルベートを2.5～10.0mg/dL又はそれ以上

含む。研究のための参照アスコルベート濃度を約50mg/dLに選択した。本発明のアスコルベート抵抗性組成物、試験手段（及び試験具）及び試験方法の好ましい実施態様は、このような試料中の過酸化物活性物質を約50mg/dLの参照濃度ばかりでなく、他の種々のアスコルベート濃度で検出することができる事が判明した。ほとんどの場合、アスコルベート濃度がキレート濃度よりも高いと、応答時間の遅延が起こる。下記のように、「ラグタイム」、即ち、観察可能の応答が起こるまでの時間は、50mg/dLのアスコルベートの存在で尿中のヘモグロビンを検出する能力について試験した、キレート濃度の変動する本発明の好ましい実施態様に関して、実験により1／3分より短時間から約1／2時間に及ぶことが判明した。

好ましい実施態様においては、本発明の組成物を使用して、過酸化物活性物質の測定用の試験手段（及び試験具）を製造する。このような好ましい実施態様では、組成物を適当な支持体マトリックスに混入させて試験手段を形成することができる。支持体マトリックスは多くの形を取ることができ、例えば米国特許第3,846,247号明細書に開示されているもの（フェルト、多孔性セラミックストリップ及び織られた又はマット状に編まれたガラス繊維）であってよい。米国特許第3,552,928号明細書に記載されているマトリックス（木材スティック、布、スポンジ材料及び粘土質物質）も適当である。英國特許第1,369,139号明細書には、支持体マトリックスとして合成樹脂フリース及びガラス繊維フェルトを使用することが示唆されている。また、英國特許第1,349,623号明細書は、下層紙マトリックスに対する被覆として細いフィラメントの光透過性綱の使用を提案している。フランス特許第2,170,623号明細書には、ポリアミド繊維が開示されている。このような開示があるにもかかわらず、支持体マトリックスとして従来使用され、本発明に使用するのに特に好ましく、適当である材料は透紙等のような吸水性材料

である。しかしながら、支持体マトリックスは前記のような種々の物理的形及び他の形であってよく、このような形がすべて本発明に使用するのに適当であり、「使用するものである。

本発明の試験手段を製造する際には、組成物の成分を種々の方法で支持体マトリックスに混入することができる。例えば、成分を水又は他の適当な溶剤、好ましくは有機溶剤、例えばエタノール、アセトン若しくはジメチルホルムアミド（DMF）並びにこれらの溶剤の混合物及び他の溶剤の混合物中に溶解又は懸濁することができる。次に、この溶液又は懸濁液を使用して吸水性透紙を含浸させることができ、例えば、試薬を適当なマトリックス上に印刷するインクのようにして含浸することができる。また、支持体マトリックスを組成物中に浸漬するか、又は例えばドクターブレードを用いて組成物で被覆することができる。

組成物の成分を支持体マトリックスに混入する現在好ましい方法は、吸水性透紙を成分の2種以上の溶液又は懸濁液で含浸することである。含浸

は、透紙片をこのような溶液又は懸濁液中に2回以上浸漬し、各浸漬後に浸漬した紙を乾燥器中で乾燥することによって達成される。こうして形成した試験手段を両面接着テープ片の片側に積層し、積層物をストリップに切断し、各ストリップをプラスチック裏張り材料（例えばポリスチレン）の長いシートに固定し、これを次に短い寸法に平行に切断して一方の端部に含浸された紙を有し、他端がハンドルとして役立つ長方形試験具を形成する。こうして形成した試験具は、2回乾燥、含浸した試験手段片を便利なハンドルを構成する長いプラスチック支持体の平坦な片面に一方の端部で固定して成る。

本発明の試験手段を作る好ましい方法は、例えばFe-HEDTAを有機ヒドロバーオキシドと一緒に、指示薬の添加前に、水性の第1回の浸漬で透紙中に導入することである。即ち、まず、透紙を1種以上の適当な溶剤及び／又は緩衝剤、例えばトリエタノールアミンボレート及びトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン-マロネート（以

下トリスマロネットと記す)と一緒にFe-HEDTA及びヒドロバーオキシドの水溶液を含浸させ、乾燥し、適当な溶剤、例えばエタノール中の指示薬の第二浸漬溶液で再び含浸し、第2回の乾燥を行う。このような、紙中にまず金属キレートを含浸させ、その後に他の活性試薬を含浸させる「2回浸漬」法は、優れたアスコルベート抵抗性及び貯蔵安定性を示す試験具を生じることが判明した。

本発明の試験手段を複製する特に好ましい方法は、金属キレート及び指示薬以外の試薬を滤紙中に、前記のような試薬の第一溶液中に浸漬し、その後紙を乾燥することによって導入し、その後、乾燥した紙を適当な溶剤中の指示薬及び増粘剤、例えばポリビニルピロリドンの溶液中に浸漬することによって指示薬を添加し、次いで2回目の乾燥を行うことである。

前記の試験組成物試薬及び他の成分の他に、他の成分、例えば種々の増粘剤、潤滑剤、緩衝剤、乳化剤及び周知の助剤を本発明の組成物、試験手

段(及び試験具)に添加することもできる。例えば、増粘剤として、ポリビニルピロリドンの他に又はその代わりに、種々の材料、例えばゼラチン、アルギン、カラゲニン、カゼイン、アルブミン、メチルセルロース等を使用することができる。潤滑剤としては、ドデシル硫酸ナトリウムを使用するのが好ましいが、長鎖有機硫酸塩及びスルホン酸塩、例えばジオクチルスルホコハク酸ナトリウム又はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを使用することもできる。緩衝剤には、トリエタノールアミンボレート及びトリスマロネットの他に、酒石酸塩、磷酸塩、フタル酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、コハク酸塩又は他の緩衝剤を使用することができる。組成物を約6.0~7.0のpH値に緩衝するのが好ましい。乳化剤としては、ポリビニルアルコール、アラビアゴム、カルボキシビルポリマー等を使用することができる。指示薬を懸濁するため有用な有機溶剤はほとんどの非反応性有機揮発性溶剤、例えばエタノール、アセトン、DMF、クロロホルム、エチレンジクロリド、ベ

ンゼン、酢酸エチル等を包含する。勿論、他の適当な溶剤を選択することは、当業者には可能なことである。

試験手段(又は試験具)を使用する際には、これを試験すべき液体又は試験すべき物質の液体懸液中に浸漬し、直ちに取り出すか、又は液体、固体或いは半固体の試料を試験手段(又は試験具)に施すことができる。試料中に過酸化物活性物質が存在すると、試験組成物は色の変化又は他の検出可能の応答を生じる。応答が色である場合には、これを試料中に含まれる過酸化物活性物質の定量的量を評価するための予め検定された色標準と比較することができる。完全な過酸化物活性物質、例えば完全な赤血球は、その他は未着色のマトリックス上に着色した斑点として現れる。溶血された過酸化物活性物質は均一にマトリックスを着色することができる。現れた色又は他の応答の量を測定するため、肉眼による比較の他、種々の機器測定法を使用することができ、人間の目の主観的測定を省くことによって試験の精度を高めること

ができる。

下記の実施例は、単に本発明の概念及び利点を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。このような限定は特許請求の範囲のみによってなされる。

実施例

A. 試験組成物

例1 Fe-HEDTA

試料中のバーオキシダーゼ又は別の過酸化物活性物質及び特にヘモグロビンの存在を測定しうる本発明の組成物を製造する実験を行った。組成物は、アスコルベート妨害遮延剤としてN-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の1:1(モル:モル、M:Mと記す)鉄キレート(Fe-HEDTA)を含むものである。HEDTA 0.278gを蒸留水100mlに溶解して、1.0mM HEDTA溶液を作り、1.0mM EDTA溶液にFeCl₃ 6H₂O 0.0270gを溶解することによってFe-HEDTAキレートを製造した。5mMの濃度のアスコルビン酸を組成物に、溶液の最終

容器内で 50 マイクロモル濃度を生じるのに充分な量で添加した。組成物の成分及びアスコルビン酸を下記の表に示した順序及び量で混合した。最終組成物溶液は、存在する他の成分の濃度と同様に、固体試験手段に混入するため同様の組成物を使用するより著しく低い濃度である 100 マイクロモル (μM) 濃度の Fe-HEDTA を含んでいた。

0.2 モル (M) クエン酸ナトリウム	
緩衝剤	9.5 ml
10 mM Fe-HEDTA	0.1 ml
1.0 g / dL デシル硫酸ナトリウム	0.1 ml
1 M クメンヒドロバーオキシド	0.1 ml
10 mM 3,3',5,5'-テトラメチルベンジン	0.1 ml
5 mM アスコルビン酸	0.1 ml

こうして製造した本発明の組成物は、溶液中に 1 デシリットル当たり 0.139 mg の最終濃度を生じるように含水血液を添加したとき、青色を形成するのが観察され、これは、試料のアスコルベート

ト濃度が 50 μM であるにもかかわらず、組成物が存在するヘモグロビンを検出することができることを示す。

例 II . . . Fe-E D T A

Fe-HEDTA ではなく、エチレンジアミン四酢酸の鉄キレート (Fe-EDTA) の 10 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。EDTA 0.292 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ を添加することによって例 I と実質的に同様にして Fe-EDTA を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様に、ヘモグロビン 0.139 mg / dL 及びアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 III . . . Fe-C D T A

Fe-HEDTA ではなく、シクロヘキシレンジアミン四酢酸の鉄キレート (Fe-CDTA) の 10 mM 溶液を使用することを除いて例 I の実験を繰り返した。CDTA 0.346 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

H_2O を添加することによって Fe-CDTA 溶液を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様に、ヘモグロビン 0.139 mg / dL 及びアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 IV . . . Fe-I M D A

Fe-HEDTA ではなく、イミノ二酢酸の鉄キレート (Fe-IMDA) の 10 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。IMDA 0.133 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ を添加することによって Fe-IMDA 溶液を製造した。こうして製造した組成物は、例 I と同様に、ヘモグロビン 0.139 mg / dL 及びアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 V . . . Fe-N T A

Fe-HEDTA ではなく、ニトリロ三酢酸の鉄キレート (Fe-NTA) の 10 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。NTA 0.191 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ を添加することに

よって Fe-NTA 溶液を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様にヘモグロビン 0.139 mg / dL 及びアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 VI . . . Fe-E D D P α

Fe-HEDTA ではなく、 α -エチレンジアミン二酢酸二ブロピオン酸の鉄キレート (Fe-EDDP α) の 10 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。EDDP α 0.320 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ を添加することによって Fe-EDDP α 溶液を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様にヘモグロビン 0.139 mg / dL 及びアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 VII . . . Fe-E D D P β

Fe-HEDTA ではなく、 α -エチレンジアミン二酢酸二ブロピオン酸の鉄キレート (Fe-EDDP β) の 10 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。EDDP β 0.320 g

を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ を添加することによって Fe-EDDPA 溶液を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様にヘモグロビン 0.139 mM およびアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 IV . . . Fe-HIMDA

Fe-HEDTA ではなく、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸の鉄キレート (Fe-HIMDA) の 1.0 mM 溶液を使用することを除いて、例 I の実験を繰り返した。HIMDA 0.177 g を蒸留水 100 ml に溶解し、例 I に記載したように $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ を添加することによって Fe-HIMDA 溶液を製造した。こうして製造した組成物は例 I と同様にヘモグロビン 0.139 mM およびアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成した。

例 IX-XVI

各例において 0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝剤を 9.5 ml ではなく、9.4 ml 使用し、各鉄キレートを 0.1 ml ではなく、0.2 ml 使用する以外は、実質

的に例 I ~ VII に記載したように実験を行って、本発明による組成物を製造した。これは各組成物中に 200 μM の濃度の鉄キレートを存在させたことになる。それぞれの場合に、200 μM の鉄キレートを含む組成物を前記のように試験すると、該組成物がヘモグロビン 0.139 mM およびアスコルベート 50 μM の存在で青色を形成するのが観察され、このことは試料中にアスコルベートが存在しても、ヘモグロビンを検出しうることを示す。しかし、例 I ~ VII の 100 μM 鉄キレート組成物を同様に試験したときに観察された色形成と比較して、色形成に必要な時間の間に差が認められた。それぞれの場合の色形成時間（「ラグタイム」と昔われれる）を下記の表に示す。この時間は前記のように、本発明の組成物に使用する金属キレート、例えば前記鉄錯体の 1 種の濃度とその組成物のアスコルベート妨害に抵抗し、過酸化物活性性質の検出しうる能力との間には一般的な関係又は相関関係はないことを示す。

例番号	金属キレート 1:1(H:N) Fe^{3+} -キレート 100 mM	金属キレート濃度 200 μM	
		例 I - IV	例 IX - XII
I 及び IX	Fe^{3+} -HEDTA	18 秒	実験せず
II 及び X	Fe^{3+} -EDTA	67 秒	実験せず
III 及び XI	Fe^{3+} -CDTA	3 分	2 1/2 分
IV 及び XII	Fe^{3+} -IMDA	5 分	7 分
V 及び XIII	Fe^{3+} -NTA	15 分	5 分
VI 及び XIV	Fe^{3+} -EDDP α	18 分	10 分
VII 及び XV	Fe^{3+} -EDDP β	31 分	18 分
VIII 及び XVI	Fe^{3+} -HMDA	20 分	20 分

B. 試験具

例 X-VII

本発明により固体状態の試験具を製造する実験を行った。この試験具は、成分の濃度を固体状態の試験具に適合するように変えた以外は、前記の例 I に記載した本発明の組成物を混入した紙支持体マトリックスから成る。マトリックスへの組成物の混入及び試験具の形成は、下記の操作を使用して実施した。

N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸 1.39 g を蒸留水 100 ml に溶解し、次いでこの溶液に $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1.35 g を添加することによって N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸の 1:1 (モル:モル) 鉄キレート (Fe-HEDTA) の 50 mM 溶液を製造した。

2 種の溶液 (組成物となる) を製造した。試験手段を製造するため、約 15.24 cm (6 インチ) × 10.16 cm (4 インチ) の寸法を有するワットマン (Whatman) 3 MM 紙片を試薬溶液で含浸

して、紙が第二回含浸後に試薬組成物を充分に含むようにした。使用した操作は、紙を第一溶液中に浸漬して含浸し、含浸した紙を乾燥し、その後、更に、乾燥した紙を第二の溶液で浸漬して含浸させ、最終的に乾燥することである。乾燥は、強制通風乾燥器中で、第1回含浸後は105℃で約8分、第2回含浸後は50℃で約5分間実施した。

第一試薬溶液は、下記の成分を混合することによって製造した。

蒸留水	74.0 ml
1Mトリスマロネート緩衝剤	
pH 6.5	10.0 ml
5.5Mクメンヒドロバーオキシド	4.0 ml
1.0g/dLデシル硫酸ナトリウム	2.0 ml
5.0mM Fe-HEDTA (前記のように製造)	1.0.0 ml

第二試薬溶液は、下記の成分を混合することによって製造した。

エタノール	79.4 ml
6-メトキシキノリン、遊離型	0.6 ml

2.0% (w/v) ポリビニルビロリ

ドン(含水)(分子量40,000) 20.0 ml

3, 3', 5, 5'-テトラメチル

ベンジン 0.6 g

乾燥し、含浸した紙を、3M・カンパニー(ST. Paul, Minn. 55144 在)から市販されている両面接着転写テープ片の片側に粘着した。次に、積層物を約15.24cm(6インチ)×0.51cm(0.2インチ)の寸法に切断した。これらの一つを、未使用の接着面で寸法約8.89cm(3.5インチ)×15.24cmのポリスチレンシートに結合し、生じた積層物を寸法の短い方に対して平行に切断し、一方の端部に含浸した紙を有し、他端がハンドルとして役立つ8.89cmの長方形ポリスチレンストリップから成る試験具を形成した。

例XVIIの操作により製造した試験具を、種々の濃度のヘモグロビン及び5.0mg/dLのアスコルベートを含む尿試料で試験したところ、種々のヘモグロビン濃度に対応する、容易に識別しうる青色レベルを生じ、試料が高濃度のアスコルベートを

含んでいるにもかかわらず、試験具は存在するヘモグロビンを検出しうることが分かった。

例XVIII

第一試薬溶液に、Fe-HEDTAの代わりに、5.0mM Fe-EDTA溶液を10.0ml使用する以外は、例XVIIの実験を繰り返した。

例XVIIIにより製造した試験具を種々の濃度のヘモグロビン及び5.0mg/dLのアスコルベートを含む尿試料で、前記のように試験したところ、種々のヘモグロビン濃度に対応する、容易に識別しうる青色レベルを生じた。

例XIX

第一試薬溶液に、Fe-HEDTAの代わりに、5.0mM Fe-CDTA溶液を10.0ml使用する以外は、例XVIIの実験を繰り返した。

例XIXにより製造した試験具を種々の濃度のヘモグロビン及び5.0mg/dLのアスコルベートを含む尿試料で、前記のように試験したところ、種々のヘモグロビン濃度に対応する、容易に識別しうる青色レベルを生じた。

例XX

第一試薬溶液に、Fe-HEDTAの代わりに、5.0mM Fe-IMDA溶液を10.0ml使用する以外は、例XVIIの実験を繰り返した。

例XXにより製造した試験具を種々の濃度のヘモグロビン及び5.0mg/dLのアスコルベートを含む尿試料で、前記のように試験したところ、種々のヘモグロビン濃度に対応する、容易に識別しうる青色レベルを生じた。

例XXI

第一試薬溶液に、Fe-HEDTAの代わりに、5.0mM Fe-NTA溶液を10.0ml使用する以外は、例XVIIの実験を繰り返した。

例XXIにより製造した試験具を種々の濃度のヘモグロビン及び5.0mg/dLのアスコルベートを含む尿試料で、前記のように試験したところ、種々のヘモグロビン濃度に対応する、容易に識別しうる青色レベルを生じた。

C. 試験具のアスコルベート妨害抵抗性及び安定性

前記の例X-VIIに記載したようにして製造した試験具の、長期貯蔵に似せたストレスの後にアスコルベートの存在で尿中のヘモグロビンを検出する能力を評価するため、更に実験を行った。新しく製造した直後の試験具及び高溫条件で長時間貯蔵した後の試験具について、実験を行った。特に、環境温度(23°C)で製造直後、並びに乾燥器中で50°Cで10日及び28日の「熱ストレッス」後に、試験具を性能について試験し、比較した。

種々のヘモグロビン濃度を含む試験尿溶液を調製した。50mg/dLの濃度でアスコルベートを含む2つのヘモグロビン溶液も調製した。

全血を蒸留水で、水100mL当たりヘモグロビン15.4mgの濃度に希釈することによってヘモグロビン15.4mg/dLを含むストック溶液を調製した。全血のヘモグロビン含有量は従来技術により予め測定しておいた。ブールし、予めスクリーニングしたヘモグロビン及びアスコルビン酸が陰性である尿試料を、盲検として併置した。次に、血液溶液をブールした尿中にピベットで加えて、ヘ

モグロビンを0.015、0.031、0.062及び0.139mg/dL含む尿溶液を作ることによって試験溶液を調製した。ヘモグロビンを0.031及び0.062mg/dL含む尿溶液を別の容器に分離し、アスコルビン酸を添加して、試験直前に溶液のアスコルベート濃度を50mg/dLにした。

例X-VIIと同様にして製造した試験具及びFe-EDTAを含まない以外は、その例に記載したようにして製造した対照試験具を盲検及び各ヘモグロビン/尿溶液で試験した。試験具を各溶液中に瞬間に浸漬し、取り出し、1分後、試験具における色形成を観察した。形成した色を浸漬後1分に相対強度について、別の試験具及び標準カラーチャートと肉眼で比較した。色は、無色(盲検)から0.139mg/dLヘモグロビン溶液で暗緑褐色に及ぶ。

この試験の結果は、下記の表に示すとおり、本発明による試験具が、アスコルベートを含む2つのヘモグロビン試料で、新しく製造した後及び50°Cの高溫に10日曝露した後に試験すると、

アスコルベートを含まない尿試料を試験するため使用した試験具の応答と同様に、ヘモグロビンの存在に対する色応答を生じることを示す。Fe-II-BDTAを含まない対照試験具の同様な試験を行った結果は、対照試験具の応答が試料中のアスコルベートによってほぼ完全に損なわれたことを示した。しかしながら、本発明のこの好ましい実施態様により製造した試験具は、50mg/dLのアスコルベートが存在しても、0.031及び0.062mg/dLの濃度のヘモグロビンを容易に検出できることを証明した。従って、Fe-EDTAの存在はアスコルベート妨害を劇的に低減した。

(以下余白)

Fe-EDTAを含む本発明の試験ストリップ具の安定性

尿試料 ヘモグロビン(mg/dL) (アスコルビン酸なし)	環境温度で新しく製造したストリップ具*		Fe-EDTAを含む本発明で新しく製造したストリップ具(対照)*	
	50°Cで10日 貯蔵したストリップ具*	50°Cで28日 貯蔵したストリップ具*	50°Cで10日 貯蔵したストリップ具*	50°Cで28日 貯蔵したストリップ具*
0(盲検)	10	10	10	10
0.015	20	20	15	22
0.031	25	25	22	30
0.062	32	30	30	35
0.139	45	40	38	40
(50mg/dLアスコルビン酸)				
0.031	25	22	20	10
0.062	32	30	28	10

* 表中の数値は、存在する標準ストリップに於いて標準カラーチャートによって測定された試験ストリップ具の性能に関する。チャートは、ヘマステックスとして市販されている、溶血試験用のラベルを付して、マイルス・ラボラトリーズ社のエームス・ディビジョンから得られる。このカラーチャートでは、「10」の数値は陰性を示し、「20」は実際のヘモグロビン又は0.015mg/dLを示し、30及び40はそれぞれヘモグロビン0.046及び0.139mg/dLに相当する。

前記の表に示した結果は、新しく製造した本発明の試験具と50℃で10日又は28日貯蔵した試験具との間では反応性にはほとんど差はないことを証明する。この結果は、同じ試験具中の鉄キレート及びヒドロバーオキシドの反応は環境温度で貯蔵した場合より熱ストレス下で一層早い速度で試験具の反応性を低減させるであろうという、予測された結果と矛盾する。このことは、本発明の組成物及び試験具の良好な安定性及び有利な「貯蔵可能時間」を証明するものである。データから分かるように、有機ヒドロバーオキシドとFe-HEDTA、Fe-HEDTAと指示薬、又はこれらの物質と他のストリップ成分との間で、高温で長時間貯蔵した後でも、明らかに非相溶性は全くないか、又はほとんどなかった。更に、金属キレート(Fe-HEDTA)を含む試験具及びFe-HEDTAを用いないで同様に製造した試験具は、アスコルベートを含まない試験溶液中のヘモグロビンの存在に対する感度において実質的に同様であり、「偽陽性」の結果を示さず、試薬の優れた相溶性

を示した。しかし、Fe-HEDTAを用いないで製造した試験具は、試験溶液中のアスコルベートの存在によって実際に完全に妨害されたが、Fe-HEDTAを含む本発明のストリップは、アスコルベートによってほとんど妨害されず、事実、0.031及び0.062mg/dL程度のヘモグロビン濃度に対して、1分後に肉眼で識別しうる色の出現によって、回答することができた。

本発明の利点を更に証明するため、例XVと同様にして製造した、即ちFe-HEDTAを含む試験具を用いて、前記と同様の試験を実施した。しかし、肉眼技術を利用するのではなく、「ラピッド・スキャナー(Rapid Scanner)」として知られている装置を使用して色形成を追跡した。この装置は、実験室用マイクロコンピュータを介在させた走査反射分光光度計である。この装置は、可視領域における反射スペクトルを迅速に測定するため使用される。コンピュータはスペクトルデータの貯蔵を可能にし、計算を行う。ラピッド・スキャナーにおける試薬ストリップの性能の測

定は、例えば、同じストリップを肉眼で観察するより下記の利点を有する：

1. 光源及び試料を取り巻く条件は一定に保持される。肉眼観察では、光源は波長においてばかりでなく、観察されるストリップの位置に関しても変動しうる。

2. 検出器の特徴は一定に保持される。肉眼観察では、検出器(即ち、観察者の目)は人により変動し、同じ人でも日によって変動しうる。

3. ラピッド・スキャナーは肉眼観察よりデータを一層精密に定量することができ、これにより結果を一層客観的に比較することができる。

ラピッド・スキャナー装置は、インヂアナ州エルクハートのマイルス・ラボラトリーズ社のエムス・ディビジョンによって作られ、構造及び性能上の特徴に関する完全な情報はそこから得られる。ゲンシャウ(M. A. Genshaw)及びロジャース(R. H. Rogers)著、Anal. Chem. Vol. 53: 1949~1952頁(1981)参照。

ラピッド・スキャナーからの三刺激値を使用

して、「Commission Internationale de l'Eclairage (フランス国パリ)に対する補遺2 Publication No. 15、測色計、(E.-I. 3.1) 1971」に含まれている常法により色差値(ΔE)を計算した。従って、この装置からのデータを以下にΔE又は色差単位として記録する。

Fe-HEDTAを含む本発明による試験ストリップ具を前記の操作を使用して、0.031mg/dL及び0.062mg/dLのヘモグロビン濃度の検出能力について試験した。若干の試験具をアスコルベートを50mg/dL含む尿試料で試験し、若干のものをアスコルベートを含まない同様の試料で試験し、若干のものを環境温度で新しく製造した後試験し、若干のものは、環境温度及び50℃で11日及び28日貯蔵した後試験した。

ラピッド・スキャナーによって提供される色差単位(ΔE)は種々のヘモグロビン濃度に対応する。Fe-HEDTAを含む試験具を0.031mg/dL及び0.062mg/dLのヘモグロビンを含み、アスコルベートが存在するか又は存在しない尿試

料で試験し、結果を下記の表に示す。

新しく製造した試験具

尿試料

ヘモグロビン (mg/dL)	アスコルビン酸 (mg/dL)	ラビッド・スキヤン ナーの結果(△E)
0.031	0	21.89
0.031	50	15.75
0.062	0	29.78
0.062	50	22.84

環境温度で28日貯藏した試験具

尿試料

ヘモグロビン (mg/dL)	アスコルビン酸 (mg/dL)	ラビッド・スキヤン ナーの結果(△E)
0.031	0	15.50
0.031	50	13.29
0.062	0	26.31
0.062	50	18.20

50℃で11日貯藏した試験具

尿試料

ヘモグロビン (mg/dL)	アスコルビン酸 (mg/dL)	ラビッド・スキヤン ナーの結果(△E)	試験具
0.031	0	20.86	
0.031	50	12.36	
0.062	0	30.04	
0.062	50	27.26	

50℃で28日貯藏した試験具

尿試料

ヘモグロビン (mg/dL)	アスコルビン酸 (mg/dL)	ラビッド・スキヤン ナーの結果(△E)	試験具
0.031	0	10.31	
0.031	50	7.78	
0.062	0	20.86	
0.062	50	16.38	

前記の実験は、前記の肉眼実験でのデータを確証する機器データを示す。このデータは、本発明の試験具の安定性並びに長期貯蔵及び高温での貯蔵後でさえこのような試験具におけるアスコルベート妨害の著しい排除を示す。

前記の例XVに記載したように本発明により製造した、即ちFe-EDTAを含む試験具について更に肉眼での試験を行った。試験具を製造した後に、試験具を種々の濃度のヘモグロビンを含む尿試料及びヘモグロビンを含まない尿試料、並びに50mg/dLのアスコルベートを含む2種のヘモグロビン濃度の試料で試験した。ある試験具は、製造直後に、あるものは乾燥器中で50℃で28日貯蔵した後に試験した。この試験の結果を下記の表に示すが、表中の数値は前記のヘマスティックス標準カラーチャートと対比して得られた肉眼での色値に対応する。これらの試験具の試験はすべて前記のようにして実施した。

Fe-EDTAを含む本発明の試験

ストリップ具の安定性

尿試料

ヘモグロビン (mg/dL)	環境温度で新しく製造した ヨルビン酸なし	50℃で28日貯蔵した ストリップ具	ストリップ具
0		10	10
0.015		12	11
0.031		20	15
0.062		30	22
0.139		35	30
(アスコルビン酸			
5.0mg/dL			
0.031		20	14
0.062		30	22

これらの後者の試験の結果は、本発明のこの実施例により製造した試験具の安定性、偽陽性結果の欠如及び著しいアスコルベート妨害抵抗性を確認する。

本発明の精神及び範囲を逸脱することなく、特に開示した本発明の好ましい実施態様から多数の変更及び変化が可能であることは明らかである。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。